

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

CT/EP 99 / 0 4 4 1 8

097720388

EP 99
4418



REC'D 01 SEP 1999	
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die Immundiagnostik in Bensheim/Deutschland und die Biomedica GmbH in Wien/Österreich haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Funktionelle Vitamin-D-Derivate und Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1 α ,25-DI-Hydroxy-Vitamin-D"

am 4. September 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 C und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 13. August 1999

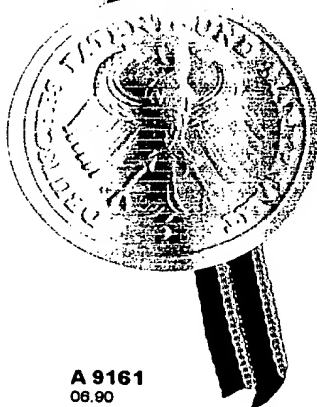
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Wohner

Aktenzeichen: 198 40 435.2



PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

A 9161

08.90
11/98

DPMA (EDV-1)

FUNKTIONELLE VITAMIN-D-DERIVATE UND VERFAHREN ZUR
BESTIMMUNG VON 25-HYDROXY- UND 1 α ,25-DIHYDROXY-VITAMIN-D

- 5 Die Erfindung betrifft Derivate von 25-Hydroxyvitamin-D, deren Herstellung sowie Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D in Proben.

10 Die D-Vitamine oder Calciferole entstehen aus ihren Provitaminen durch eine Sonnenlicht-katalysierte Spaltung des B-Rings im Sterangerüst. Ihre wichtigsten Vertreter sind Vitamin-D₃ (Cholecalciferol) und Vitamin-D₂ (Ergocalciferol), welche sich nur in den Seitenketten geringfügig unterscheiden, die aber - soweit bekannt - gleich

15 metabolisiert werden und identische biologische Wirkungen besitzen. Während Provitamin-D₂ mit der Nahrung aufgenommen werden muss, kann das Provitamin-D₃ im menschlichen Organismus gebildet werden. Soweit durch Indizes nicht näher bezeichnet, umfasst die Bezeichnung

20 Vitamin-D nachstehend allgemein alle Vitamin-D-Formen. In der Haut gebildetes oder mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin-D wird im Plasma vom Vitamin-D-Bindungs- oder -Transportprotein (DBP) gebunden, zur Leber transportiert und dort zu 25-Hydroxyvitamin-D (25-OH-D) metabolisiert.

25 Das Vitamin-D-bindende Protein DBP ist auch als Gc-Globulin oder *group specific component* bekannt (John G. Haddad in J. Steroid Biochem. Molec. Biol. (1995) 53, pp 579-582). Über 95% des im Serum messbaren 25-Hydroxyvitamin-D ist in der Regel 25-Hydroxyvitamin-D₃.

30 25-Hydroxyvitamin-D₂ wird nur in höheren Anteilen gefunden, wenn die Person unter einer Medikation mit Vitamin-D₂ steht oder, wie in den Vereinigten Staaten häufig praktiziert, die Nahrung mit Vitamin-D₂ angereichert wird.

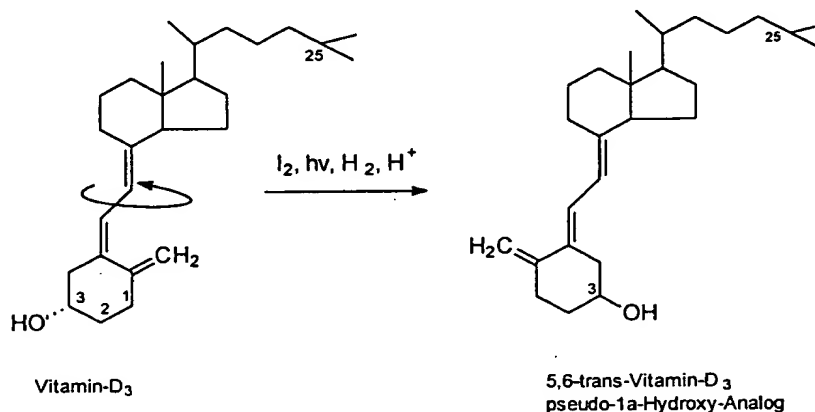
35 25-Hydroxyvitamin-D ist der vorherrschende Vitamin-D-Metabolit im Blutkreislauf und seine Konzentration im Serum beschreibt allgemein den Vitamin-D-Status, d.h.,

inwieweit dem Organismus Vitamin-D zur Verfügung steht. 25-Hydroxyvitamin-D wird bei Bedarf in der Niere zu $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin-D metabolisiert, einer hormonartigen Substanz mit hoher biologischer Wirkung. Die Bestimmung von $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin-D gibt an, wieviel Vitamin-D sich in der aktivierten Form befinden.

Die Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin-D in einer Probe erfolgt bevorzugt nach dem Prinzip der kompetitive Proteinbindungsanalyse, wobei anhand der Verdrängung von radioaktivem 25-Hydroxyvitamin-D von den Bindungsstellen eines Vitamin-D-bindenden Proteins das in der Probe vorhandene 25-Hydroxyvitamin-D quantifiziert wird. Daneben haben sich seit einigen Jahren Radioimmunoassays mit ^{125}I -markierten Vitamin-D-Derivaten und Antikörpern gegen Vitamin-D-Derivate in der Diagnostik etabliert. Die Angaben zum üblichen 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegel im Serum schwanken je nach Labor. Es besteht aber Einigkeit dahin, dass die Konzentration von 25-Hydroxyvitamin-D im Serum in der Regel größer als 5 ng/ml und kleiner als 80 ng/ml ist. Die kompetitive Proteinbindungsanalyse verlangt den Einsatz eines radioaktiven Vitamin-D-Derivats, welches das gleiche Proteinbindungsverhalten besitzen muss wie 25-Hydroxyvitamin-D. Ähnliches gilt auch für die kompetitive Bindungsanalyse für das biologisch aktive $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin-D oder andere Vitamin-D-Metaboliten.

Die europäischen Patentschriften 0 312 360 und 0 363 211 sowie Tanabe et al. (J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1989, pp. 1220-1221 und J. Nutri. Sci. Vitaminol. (1991) 37, pp. 139-147) offenbaren verschiedene ^{125}I -markierte Hydroxy- und Dihydroxyvitamin-D-Derivate und deren Verwendung in Bindungsanalysen. Nachteilig an diesen Derivaten ist, dass sie problematisch herzustellen und extrem labil sind. Licht, radioaktive Strahlung, Protonen, Wasserstoff, Enzyme, freie Radikale oder die

Gegenwart von Iod in freier oder gebundener Form haben großen Einfluss auf die Raumstruktur und die Bindeeigenschaften der Vitamin-D-Derivate an Vitamin-D-bindendes Protein DBP oder spezifischen Antikörpern. Sie können vor allem eine Drehung des A-Rings im Sterangerüst verursachen oder katalysieren. Die 3β -Hydroxygruppe des Vitamin-D-Moleküls wird dabei in die Pseudo- 1α -Position gedreht, so dass dann das 5,6-trans-Vitamin-D vorliegt. Die sogenannten Pseudo- 1α -Hydroxy-Analogen des Vitamin-D werden zwar ähnlich wie Vitamin-D metabolisiert, sie haben aber eine in wesentlichen Punkten andere Struktur und werden von Vitamin-D-bindenden Proteinen wie bspw. DBP/Gc-Globulin oder Anti-Vitamin-D-Antikörper nicht oder deutlich schlechter gebunden.



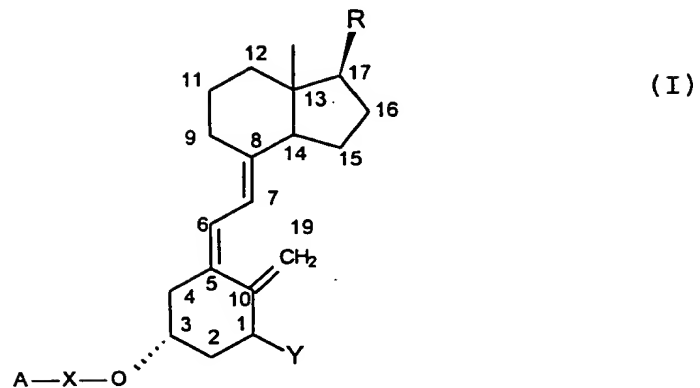
Die vorstehend beschriebene Umlagerung ist als Beispiel zu verstehen. Es treten auch andere chemische Reaktionen und Umlagerungen auf. Gleiches gilt für 3H - oder ^{14}C -markierte Vitamin-D-Derivate. Auch diese Vitamin-D-Derivate sind nicht so stabil, dass sie eine zuverlässige Bindungsanalyse erlauben. Die radioaktive Markierung steigert zudem die Kosten für Lagerung, Transport und Entsorgung und ist allgemein nachteilig für Gesundheit und Umwelt. Ferner ist die Halbwertszeit von ^{125}I od

vergleichsweise kurz. Eine kompetitive Bindungsanalyse mit ^3H - und ^{14}C -markierten Vitamin-D-Derivaten hingegen verlangt besondere Szintillationszähler und ist apparativ anspruchsvoller, bei weitgehend gleichen Problemen.

5 Ray et al. (Biochemistry, 1991, 30, 4809-4813) offenbaren die Kopplung von Vitamin-D₃ mit verschiedenen farbgebenden Gruppen. Die Nachweisempfindlichkeit für die farbstoffmarkierten Vitamin-D₃-Derivate ist aber zu gering,
10 als dass man sie in einer kompetitiven Bindungsanalyse für natürliche Vitamin-D-Metabolite einsetzen könnte, abgesehen davon, dass die farbstoffmarkierten Derivate in Serum nicht stabil und zudem besonders lichtempfindlich sind.

15 Es ist Aufgabe der Erfindung, Vitamin-D-Derivate zur Verfügung zu stellen, die in einer kompetitiven Bindungsanalyse oder ganz generell in Immunoassays von Vitamin-D-Metaboliten wie 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D
20 eingesetzt werden können. Dies setzt folgende Eigenschaften voraus, erstens, dass für die Vitamin-D-Derivate eine Nachweisempfindlichkeit besteht, welche höher ist, beziehungsweise in einem niedrigeren Konzentrationsbereich liegt, als die Konzentration der gesuchten
25 Vitamin-D-Metabolite in den Proben; zweitens, dass die Derivate in Serum, Plasma oder Urin unter üblichen protischen Bedingungen und gegenüber Serumenzymen stabil sind; und schließlich drittens, dass die Derivate über Wochen und Monate hinreichend licht- und lagerstabil
30 sind.

Diese Aufgabe wird gelöst durch Vitamin-D-Derivate der Formel



worin ist:

- O das Sauerstoffatom einer Ethergruppe;
- X eine substituierte oder unsubstituierte Kohlenwasserstoffstoffgruppe von 0,8 bis 4,2 nm Länge, bevorzugt ein C8- bis C12-gruppe, die übliche Heteroatome wie S, O, N oder P aufweisen kann;
- Y Wasserstoff oder eine Hydroxygruppe;
- A eine funktionelle Gruppe, die von einem bindenden Protein wie einem Antikörper oder Vitamin-D-bindendes Protein DBP mit hoher Affinität gebunden wird;
- R die Seitengruppe eines Vitamin-D-Metabolits, bevorzugt die Seitengruppe von Vitamin-D₂ oder D₃, besonders bevorzugt die 25-hydroxylierte Seitengruppe von Vitamin-D₂ oder D₃.

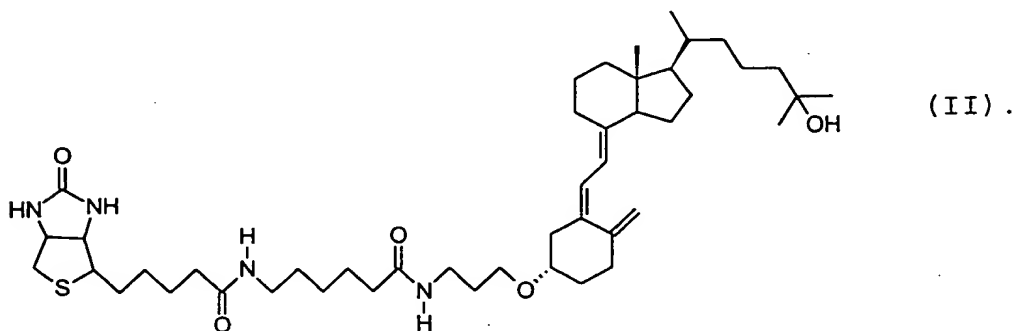
Eine hohe Affinität liegt vor, wenn die Dissoziationskonstante (K) zwischen dem bindenden Protein, z.B. dem Antikörper oder DBP, und dem Antigen bzw. der funktionelle Gruppe A größer 10^8 ist. Eine Dissoziationskonstante größer 10^{16} ist für viele Anwendungen vorteilhaft. In einer bevorzugten Ausführungsform ist A ausgewählt aus Biotin, Digoxigenin, Tyrosin, substituiertem Tyrosin, substituierten Aminosäuren, charakteristischen Aminosäure- und Peptidsequenzen, FITC, Proteinen und Proteingruppen wie Protein

Daneben besitzt die erfindungsgemäße Abstandsgruppe über-
35 raschenderweise einen sterischen Effekt, als sie offenbar
eine 180°-Drehung des A-Rings aktiv verhindern hilft. Es

423.08.99

wird vermutet, ohne an diese Theorie gebunden zu sein, dass das 3β -Sauerstoffatom der Ethergruppe am A-Rings entsprechend einer natürlichen Hydroxygruppe hydratisiert ist und so einen Angriff auf die 5,6-Doppelbindung verhindert, abgesehen von anderen elektronischen und sterischen Effekten. Ein anderer wichtiger Aspekt ist, dass die erfindungsgemäße Ethergruppe von den im Serum oder Plasma stets vorhandenen Esterasen nicht gespalten werden kann.

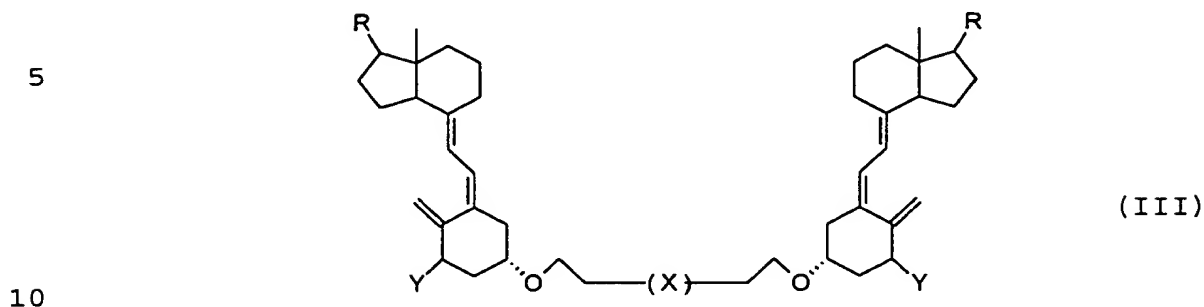
Ganz besonders bevorzugt ist 25-Hydroxy-Vitamin-D₃- 3β -3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether der Formel



und die 1α -Hydroxy- und Vitamin-D₂-Analogen.

Weiterhin bevorzugt sind Derivate, die als zweite funktionelle Gruppe einen Vitamin-D-Rest enthalten. Der Vorteil dieser Derivate ist, dass sie keine systemfremden Gruppen und Verbindungen enthalten und so eine erhöhte Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit der kompetitiven Bindungsanalyse erlauben, auch weil sich eventuelle Bindungsbesonderheiten aus erster und zweiter Bindung des Vitamin-D-bindenden Proteins bei einer quantitativen

Bestimmung kompensieren. Besonders bevorzugt sind Verbindungen der nachstehenden Formel III:



worin R, Y und X wie in oben in Formel I definiert sind. Besonders günstig sind dabei symmetrische Vitamin-D-Derivate.

15 Die erfindungsgemäßen 25-Hydroxy- und 1 α ,25-Hydroxy-Vitamin-D-Derivate sind überraschend licht-, lager- und serumstabil und erlauben in allen kompetitiven immun-

20 diagnostischen Verfahren eine empfindliche, zuverlässige quantitative Bestimmung von Vitamin-D-Metaboliten wie 25-Hydroxy- und 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin-D, beispielsweise für die Routinediagnostik im Human- und Veterinärmedizin-

bereich sowie in der Forschung.

25 Erfindungsgemäß wird die Verbindung der Formel I erhalten durch ein Verfahren, umfassend die Schritte:

a) Cyanoethylierung der 3-Hydroxygruppe von Vitamin-D oder 25-Hydroxyvitamin-D mit Acrylnitril in einem geeigneten Lösungsmittel wie Acetonitril in

30 Gegenwart von Kaliumhydrid und tert.-Butanol;

b) Reduktion der resultierenden Nitrilgruppe mit einem Gemisch aus Lithiumhydrid und Lithiumaluminiumhydrid zu einem Amin; und

c) Anhängen einer Abstandsgruppe, gegebenenfalls

35 zusammen mit einer funktionellen Gruppe A an das Amin, bspw. Biotinylieren der Verbindung mit einem aktivierten

Biotinylierungsreagenz wie LC-BHNS oder, zum Erhalt eines Vitamin-D-Derivats gemäß Formel III, Kopplung von zwei Amino-Vitamin-D-Gruppen durch Kondensation mit einer Dicarbonsäure wie Sebacinsäure mittels Carbodiimid.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung funktio-
neller Vitamin-D-Derivate ergibt höhere Ausbeuten bei
kürzeren Reaktionszeiten. Anders als in herkömmlichen
Verfahren erfolgt nämlich in Schritt a) die Cyano-
10 ethylierung der 3-Hydroxygruppe in Gegenwart von
Kaliumhydrid und tert.-Butanol. Dadurch wird erreicht,
dass nur an der 3-Hydroxy-Gruppe von Vitamin-D eine
Cyanoethylierung erfolgt und die andere Hydroxygruppen
des Vitamin-D vor einer Umsetzung geschützt sind. Die-
15 Umsetzung erfolgt bei 0 bis 20°C, bevorzugt bei 5 bis 8°C
in einem neutralen Lösungsmittel wie Acetonitril.

Bei der nachfolgenden Reduktion wird die Nitrilgruppe des
Cyanoethylethers quantitativ in das Amin überführt,
20 welches dann vergleichsweise einfach mit einer anderen
funktionellen Gruppe verknüpft werden kann, zum Beispiel
durch Umsetzung mit einem handelsüblichen Biotinylie-
rungsreagenz.

25 Die Erfindung umfasst zudem die Verwendung der erfin-
dungsgemäßen funktionellen Vitamin-D-Derivate in Ver-
fahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1 α ,25-Hydroxy-
Vitamin-D in Serum, Plasma, Urin oder einer anderen
Probe. Hierbei wird das erfindungsgemäße funktionelle
30 Vitamin-D-Konjugat entweder als Zwischenglied eingesetzt,
wobei das Vitamin-D-bindende Protein und nativer Vitamin-
D-Metabolit um die Bindestelle kompetitieren, oder selbst
als kompetitive Bindungskomponente zu nativem Vitamin-D.
Das quantitative Bestimmungsverfahren ist vorzugsweise
35 ein EIA, ELISA, RIA, IRMA, LiA oder ILMA, FIA oder IFMA
in manuell abzuarbeitenden Testsystemen oder auf

Automaten angepasste Versionen in Flüssigphasen- wie Festphasentechnik.

Ein besonders bevorzugtes Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D-Derivaten umfasst die Schritte: a) Beschichten eines Trägers mit Streptavidin, b) Zugabe ein oder mehrerer multifunktionaler Biotin-Vitamin-D-Derivate, c) Zugabe der Probe und einer definierten Menge Vitamin-D-bindendes Protein, d) Bestimmung des gebundenen Bindungsproteins mit markierten anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörpern. Die Markierung der anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörper kann direkt sein, bspw. eine radioaktive Markierung, oder auch indirekt, bspw. ein Enzym oder ein aktives Enzymfragment wie Peroxidase, das eine Farbreaktion zu katalysieren vermag.

Ein weiteres bevorzugtes Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D-Derivaten umfasst die Schritte: a) Beschichten eines Trägers mit anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörpern, b) Zugabe des Vitamin-D-Bindungsproteins, c) Zugabe der Probe sowie eine definierte Menge Biotin-Vitamin-D-Derivat, d) Bestimmung der Menge gebundenes Derivat mit markiertem Streptavidin. Das Streptavidin ist bevorzugt indirekt mit Peroxidase markiert; der Träger ist vorzugsweise eine Reaktionsgefäßwand, beispielsweise von einer Mikrotiterplatte, oder Teilchen aus polymerem oder magnetischem Material oder beidem, beispielsweise Kunststoff- oder Cellulose-Mikropartikel.

Diese Verfahren ermöglichen eine nicht-radioaktive quantitative Bestimmungen von 25-Hydroxy- und $1,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D, ohne dass aufwendige Sicherheitsvorkehrungen erforderlich sind. Die hier vorgeschlagenen kompetitiven Verfahren sind somit für Routineuntersuchun-

gen im Rahmen einer Osteoporose-Prophylaxe, bei einer vermuteten D-Hypovitaminose oder D-Hypervitaminose, zur Diagnostik allgemeiner Art und in der Forschung.

- 5 Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Kit zur Bestimmung von Vitamin-D-Metaboliten wie 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D, der unter anderem das erfindungsgemäße funktionelle Vitamin-D-Derivat enthält. Der Kit umfasst wahlfrei Vitamin-D-Bindungsprotein (Gc-
10 Globulin), anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörper, Streptavidin und vorbehandelte oder unvorbehandelte Mikrotiterplatten und/oder magnetische oder andere Mikropartikel und andere Reagenzien.
- 15 Weitere Vorteile, Merkmale und Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den nachstehenden Beispielen und den beiliegenden Zeichnungen. Es zeigt:

20 Fig. 1 den schematischen Syntheseweg für das bifunktionelle Vitamin-D-Derivat 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-3' [6-N- (biotinyl) hexamido]amidopropyl-ether) gemäß der Erfindung;

25 Figuren 2, 3 und 4 Schemadarstellungen verschiedener ELISAs zur Bestimmung von 25-Hydroxy-Vitamin-D mit Hilfe des erfindungsgemäßen 25-Hydroxy-Vitamin-D-Konjugat;

30 Fig. 5 die Eichkurve eines kompetitiven ELISAs für 25-Hydroxy-Vitamin-D nach Fig. 2;

35 Figuren 6 und 7 Schemadarstellungen kompetitiver RIA für 25-Hydroxy-Vitamin-D mit Hilfe des erfindungsgemäßen 25-Hydroxy-Vitamin-D-Konjugats;

Figuren 8, 9 und 10 Schemadarstellungen kompetitiver, radioaktiver IRMAS für 25-Hydroxy-Vitamin-D mit Hilfe des erfindungsgemäßen 25-Hydroxy-Vitamin-D-Konjugats;

5

Figuren 11 und 12 Schemadarstellungen kompetitiver ELISAs unter Verwendung von Mikropartikeln;

Figur 13 Schemadarstellung eines kompetitiven Bindungsassays für 25-Hydroxyvitamin-D mit Hilfe eines 25-Hydroxyvitamin-D-Konjugats gemäß der Erfindung und einem direktmarkierten Vitamin-D-bindenden Protein.

Figur 1 zeigt den erfindungsgemäßen Syntheseweg zur Herstellung des bifunktionellen 25-Hydroxy-Vitamin-D-Konjugats. Zunächst wird 25-Hydroxy-Vitamin-D in einem Gemisch aus Acetonitril, Kaliumhydrid und tert.-Butanol mit Acrylnitril cyanoethyliert. Durch die Gegenwart des als Base fungierenden Kaliumhydrids und durch die Anwesenheit von tert.-Butanol zur Abwendung unspezifischer Reaktionen an der 25-Hydroxygruppe wird erreicht, dass selektiv die 3-Hydroxy-Gruppe des Vitamin-D cyanoethyliert wird. Die Ausbeute an 25-Hydroxy-Vitamin-D-3 β -cyanoethylether beträgt in der Regel etwa 74% bei einer Reaktionsdauer von 40 Minuten.

Nach üblicher Aufarbeitung wird der 25-Hydroxy-Vitamin-D-3 β -cyanoethylether mit Lithiumhydrid versetzt und die 25-Hydroxygruppe in das Lithiumalkoholat überführt. Es folgt eine Reduktion des Nitrils mit LiAlH₄ zu 25-Hydroxy-Vitamin-D-3 β -3'-aminopropylether. Dieser Schritt ist quantitativ, ohne dass Nebenprodukte auftreten. Zuletzt erfolgt gegebenenfalls eine Biotinylierung mit einem aktivierten Biotinylierungsreagenz wie LC-BHNS (Biotinyl-N- ϵ -aminocaproyl-hydroxysuccinimidester). Die resultie-

rende Abstandsgruppe X hat entsprechend der Aminocaproyl-
kette eine Länge von etwa 0.8 bis 0.9 nm.

25-Hydroxy-Vitamin-D-3 β -3' [6-N- (biotinyl) hexamido] amido-
propylether ist temperaturstabil und kann in einer
wässrigen, leicht sauren Matrix über mehrere Monate
gelagert werden. Da die Verbindung von Serumenzymen nicht
gespalten wird, eignet sie sich bestens für diagnostische
Routinetests in Serum, Plasma und Urin.

Figur 2 zeigt eine Schemadarstellung eines kompetitiven
ELISA für 25-Hydroxy-Vitamin-D. Hierbei wird das 25-
Hydroxy-Vitamin-D-Konjugat (25-Hydroxy-Vitamin-D-3 β -3' [6-
N- (biotinyl) hexamido] amidopropylether) über Streptavidin-
an eine feste Phase gebunden. Dann erfolgt in flüssiger
Phase die kompetitive Bindung von Vitamin-D-bindenden
Protein und 25-Hydroxy-Vitamin-D aus Standard oder Probe
an das 25-Hydroxy-Vitamin-D-Konjugat. Der Nachweis
erfolgt durch Peroxidase-markierte Antikörper gegen das
Vitamin-D-bindende Protein. Der Fachmann weiß, dass auch
andere Markerenzyme verwendet werden können, zum Beispiel
alkalische Phosphatase oder Galaktosidase, etc.

Fig. 3 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven,
nicht-radioaktiven ELISA, wobei das Vitamin-D-bindende
Protein zunächst über anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-
Antikörper an die feste Phase gebunden wird. Danach
erfolgt in flüssiger Phase die kompetitive Bindung von
25-Hydroxy-Vitamin-D-Biotin und 25-Hydroxy-Vitamin-D aus
Standard bzw. Probe. Zur Bestimmung wird dann Peroxidase-
markiertes Streptavidin eingesetzt. Das gezeigte Prinzip
lässt sich selbstverständlich auf andere Tracer-Gruppen
statt Biotin und auf andere Markerenzyme, wie oben
angegeben, übertragen.

Fig. 4 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven ELISA, wobei das Vitamin-D-bindende Protein direkt an die feste Phase gebunden ist. Die kompetitive Bindung von 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Biotin und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard bzw. Probe erfolgt in flüssiger Phase und Peroxidase-markiertes Streptavidin wird zur quantitativen Bestimmung eingesetzt.

Figur 5 zeigt die typische Eichkurve eines kompetitiven ELISA mit 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Biotin gemäß dem in Figur 2 gezeigten Prinzip. Die Menge an gebundenem Vitamin-D-Bindungsprotein wurde bestimmt durch eine standardisierte Farbreaktion mit Peroxidase-gekoppelten anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörpern und Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat. Alternative Substrate wären beispielsweise OPD (1,2-Phenyldiamin x 2 HCl), ABTS und andere. Für die Eichkurve wurden Vitamin-D-Proben mit Konzentrationen von 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nmol/l eingesetzt. Die Ordinate zeigt die optische Dichte als Mittelwert von zwei Messungen bei 450 nm; die Abszisse die Konzentration an kompetitierenden 25-Hydroxy-Vitamin-D in nMol/l.

Fig. 6 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven Protein-Bindungsversuch (CPBA), wobei 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Biotin und 25-Hydroxy-Vitamin-D aus Standard bzw. Probe in flüssiger Phase um die Bindungsstelle des Vitamin-D-Bindungsproteins kompetitieren. Es wird ¹²⁵I-markiertes Streptavidin für die quantitative Bestimmung verwendet.

Fig. 7 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven Radioimmunoassays (RIA), wobei 25-Hydroxy-Vitamin-D-Biotin und 25-Hydroxy-Vitamin-D aus Standard bzw. Probe in flüssiger Phase um die Bindungsstelle eines anti-Vitamin-D-Antikörpers kompetitieren. Für die quantitative Bestimmung wird ¹²⁵I-markiertes Streptavidin eingesetzt.

Erfolgt die Bestimmung durch ein Streptavidin, das nicht radioaktiv, sondern mit einem Fluorophor oder Luminophor markiert ist, liegen sogenannte LIA- oder FIA-Assays vor.

5 Fig. 8 zeigt die Schemadarstellung eines 25-Hydroxy-Vitamin-D-IRMA. Es wird zunächst 25-Hydroxy-Vitamin-D-Biotin über Streptavidin an die feste Phase gebunden. Die kompetitive Bindung von Vitamin-D-Bindungsprotein an das Konjugat und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard oder Probe erfolgt dann in flüssiger Phase. Die Menge des Konjugat-
10 gebundenen Bindungsproteins wird mit ¹²⁵I-markierten Antikörpern bestimmt.

Fig. 9 ist die Schemadarstellung einer IRMA-Sandwich-
15 Technik (Immunoradiometrischer Assay). Hierzu werden anti-Vitamin-D₃-Antikörper an die feste Phase gekoppelt. An diese binden dann Vitamin-D-Bindungsproteine. Die Kompetition erfolgt im nächsten Schritt zwischen dem 25-Hydroxy-Vitamin-D-Konjugat und 25-Hydroxy-Vitamin-D aus
20 Standard oder Probe. Die Bestimmung der Menge gebundenen Konjugat erfolgt durch ¹²⁵I-markiertes Streptavidin.

Fig. 10 zeigt die Schemadarstellung eines weiteren IRMA-Sandwich-Technik. Es wird zunächst Vitamin-D₃-
25 Bindungsprotein an die feste Phase gekoppelt. Dann erfolgt daran die kompetitive Bindung zwischen dem 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Konjugat und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard oder Probe. Die Menge gebundenen Konjugat wird durch ¹²⁵I-markiertes Streptavidin bestimmt.

30 Fig. 11 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven ELISA unter Verwendung von Mikropartikeln. Hierbei wird 25-Hydroxy-Vitamin-D-Biotin über Streptavidin an Mikropartikel gebunden. Dann wird 25-Hydroxy-Vitamin-D-Derivat daran gebunden. In flüssiger Phase wird Vitamin-D-Bindungsprotein und die jeweilige Probe zugegeben.
35

Bindungsproteine und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard oder Probe kompetitieren um die Bindungsstelle des Konjugats. Die gebundenen Bestandteile werden dadurch abgetrennt, dass sie über die Mikropartikel von einem
 5 Magneten zurückgehalten werden, während der Überstand mit den ungebundenen Substanzen entfernt wird. Die Menge gekoppeltes Bindungsprotein wird bestimmt in einem zweistufigen Verfahren mit einem primären Antikörper gegen Vitamin-D-Bindungsprotein und einem sekundären
 10 Peroxidase-markierten Antikörper.

Fig. 12 zeigt eine Schemadarstellung eines kompetitiven ELISA unter Verwendung von Mikropartikeln. Es wird 25-Hydroxy-Vitamin-D-Biotin über Streptavidin an
 15 Mikropartikel gebunden. Dann wird die flüssige Probe mit 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ (aus Standard oder Probe) dazugegeben sowie eine nicht-sättigende Menge Antikörper. Das Konjugat und das native Vitamin-D₃ kompetitieren um die Bindung des Antikörpers. Die Menge gebundener
 20 Antikörper erfolgt durch Agglutination der Mikropartikel. Diese kann beispielsweise direkt durch Nephelometrie bzw. Turbidimetrie bestimmt werden.

Fig. 13 zeigt das Schema eines kompetitiven Bindungsassays, wobei das Vitamin-D-bindende Protein direkt markiert ist, beispielsweise radioaktiv mit ¹²⁵Iod, oder
 25 für eine Elektrochemolumineszenz mit Ruthenium(II)tris-(bipyridin)-NHS-ester. Die Markierung können auch Enzyme sein wie Peroxidase, alkalische Phosphatase, β-Galactosidase u.a., oder auch FITC.
 30

Die bekannten Bestimmungsverfahren für Proteine wie der kompetitive ELISA beruhen auf dem Prinzip, dass die nachzuweisende Verbindung mit einem Bindungsprotein oder
 35 Konjugat um eine Bindungsstelle kompetitiert. Es wird dann die Menge gebundenes Bindungsprotein oder Konjugat

bestimmt und anhand einer Eichkurve die Konzentration der nachzuweisenden Verbindung ermittelt.

Die in den Figuren gezeigten Testprinzipien lassen sich
 5 einfach auf andere Vitamin-D-Derivate übertragen. Besonders erwähnt sei $1\alpha,25$ -Hydroxyvitamin-D₂/D₃. In diesem Fall muss ein Bindungsprotein bzw. ein Rezeptor oder Antikörper gewählt werden, der das $1\alpha,25$ -Hydroxy-Vitamin-D-Analoge spezifisch erkennt. Das zugehörige
 10 bifunktionelle $1\alpha,25$ -Hydroxyderivat kann gewonnen werden enzymatisch durch Umsetzung von 25-Hydroxy-Vitamin-D-3 β -cyanoethylether mit 25-Hydroxy-Vitamin-D- 1α -Hydroxylase, Reduktion zum Amin und schließlich Addition der zweiten funktionellen Gruppe. Ferner werden hier Derivate von
 15 Vitamin-D₂ und Vitamin-D₃ vorgeschlagen. Deren Synthese kann auf dem in Beispiel 1 vorgestellten Weg erfolgen

BEISPIELE

20 **Beispiel 1: Synthese von 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3 β -3'[6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether (4)**

Alle Umsetzungen erfolgten im Dunkeln unter trockener Stickstoffatmosphäre. Zwischenprodukte wurden bei -20°C gelagert. Es wurden HPLC-reine Lösungsmittel eingesetzt.
 25 Das 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ war von BIOMOL Feinchemikalien GmbH, Hamburg, der LC-BHNS (Long-Chain-Biotinyl-N- ϵ -aminocaproyl-hydroxysuccinimidester) von Sigma Chemie, alle weiteren Chemikalien von Fluka, Darmstadt. Die Massenspektroskopie (FAB) erfolgte mit einem Finigan-MAT-
 30 90, die NMR-Messungen mit einem Bruker-ARX-400 (400 MHz) oder einem Bruker-ARC-250F (250 MHz).

(i) 25-Hydroxyvitamin-D₃-3β-cyanoethylether (2)

5 mg 25-Hydroxyvitamin-D₃ (12,5 μMol), gelöst in Methylenchlorid (CH₂Cl₂), wurde in einen mit Stickstoff gefüllten Kolben überführt und das Lösungsmittel abgezogen. Der feste Rückstand wurde in 1 ml Acetonitril aufgenommen und versetzt mit 10 Tropfen einer Mischung von tert.-Butanol und Acetonitril (9:1 v/v) sowie 130 μMol Acrylnitril (10 eq.) in 100 μl Acetonitril [Stammlösung: 86 μl Acrylnitril (1.3 mMol) verdünnt mit Acetonitril auf 1 ml]. Die klare Lösung wurde 15 Minuten bei 6°C gerührt. Es wurde 6.25 μMol Kaliumhydrid (0,5 eq.) in 25 μl tert.-Butanol/Acetonitril (9:1 v/v) [Stammlösung: 10 mg KH (250 μMol) in 1 ml tert.-Butanol/Acetonitril (9:1 v/v)] zugegeben. Die dabei entstehende Ausflockung löste sich sofort wieder. Die Mischung wurde bei 6°C gerührt. Die wiederholte Dünnschichtchromatographie (DC) einzelner Proben mit 20% Petrolether in Methyl-tert.-butylether (MTBE) auf Kieselgel zeigte, dass nach 10 Minuten bereits 90% der Ausgangsverbindung umgesetzt waren. Nach 15 Minuten wurden wenige Tropfen Reaktionsgemisch mit etwa 5 Tropfen Wasser und 0,5 ml MTBE aufgearbeitet. Die DC der organischen Phase zeigte kein Edukt mehr. Nach 40 Minuten wurde das gesamte Reaktionsgemisch mit Wasser/MTBE aufgearbeitet. Es wurde 4 mg öliges Produkt erhalten.

IR (NaCl/CH ₂ Cl ₂):	3422,	OH
	2941, 2872	CH
	2252	Nitril
	1105	Ether

Die HPLC-Analyse (3% MeOH/CH₂Cl₂) ergab 93% Produkt und 7% Edukt. 4 mg Produkt enthielten somit 3.7 mg (8,2 μMol) Zielverbindung, was einer Ausbeute von 74% entspricht.

(ii) 25-Hydroxyvitamin-D₃-3β-3'-aminopropylether (3)

3.75 mg (8.3 μMol) Nitril aus (i) wurde in 2 ml Ether
gelöst, mit 125 μMol Lithiumhydrid gelöst in 1 ml Ether
(Stammlösung: 7 mg frisches feinpulvrige LiH in 7 ml
5 Ether) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur unter
Stickstoff gerührt. Es wurde 169 μMol LiAlH₄ als Auf-
schlammung in 1 ml Ether (Stamm: 18 mg frisches
feinpulvrige LiAlH₄ in 3 ml Ether) zugegeben. Nach einer
weiteren Stunde wurde das Gemisch mit 1 ml konzentriertem
10 KOH, 5 ml H₂O und 4 x 20 ml MTBE aufgearbeitet. Die Dünnschichtchromatographie einer Probe mit 1:1 MTBE/Petrol-
ether auf Kieselgel zeigte nur noch den Ausgangspunkt.
Das Diol lag bei R_f 0.27; das Nitril bei R_f 0.4. Die
gewonnene Substanz wurde ohne weitere Analyse und Auf-
15 reinigung weiterverarbeitet.

(iii) 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-3' [6-N-(biotinyl)hex-
amido]amidopropylether (4)

Es wurde 3 mg (6.6 μMol) 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-
aminopropylether (3) aus (ii) in 1 ml Dimethylformamid
20 (DMF) gelöst. Dann wurde unter Stickstoff 3 mg (6.6 μMol)
LC-BNHS und 1 μl (17.5 μMol) Triethylamin zugegeben. Es
wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt, das DMF abgezogen
und der Rückstand mit 20% Methanol (MeOH) in CH₂Cl₂
vorgereinigt. 12 mg (> 100%) der so gewonnenen Substanz
25 wurden mittels HPLC gereinigt (Bedingungen: Knauer
Kromasil-100, 5 μM, 250 x 4 mm, 10% MeOH in CH₂Cl₂, 1,5
ml/min, OD 265 nm, 7 Minuten). Die Ausbeute betrug 1,2 mg
(1,5 μMol). Dies entspricht 12%, bezogen auf das 25-OH-
Vitamin-D₃ und 18% bezogen auf die Nitrilverbindung.

30

MS (Finigan MAT 90)

(FAB): 797 (MH⁺) vom 5.9.97 und 28.11.97

¹ H-NMR (Bruker ARX 400) in CDCl₃/TMS bei 400 MHz.

35 Die Analysedaten sind in Tabelle I gezeigt.

Tabelle I

Biotin-25-Hydroxyvitamin-D3				
	H	Mult	cc [Hz]	Zuordnung
6,42	1	Dd	5,7	NH (Biotin)
6,2	1	D	11	6
6,0	1	D	11	7
5,85	1	Dd	5,7	NH (Biotin)
5,55	2	M		3-O-CH ₂ (28)
5,38	1	S		NH oder OH
5,05	1	D	2	19
4,83	1	D	2	19
4,77	1	S		NH oder OH
4,51	1	M		HC-NH I Biotin
4,33	1	M		HC-NH II Biotin
3,53	1	M		3
2,53	1	D	10	4
1,21	6	S		26, 27-CH ₃
0,93	3	D	6	21-CH ₃
0,54	3	S		18-CH ₃

Beispiel 2: Stabilität von 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether

Es wurde jeweils 20 mg gereinigte 25-OH-D₃-Biotin-Verbindung (25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-3' [6-N-(biotinyl)-hexamido]amidopropylether) aus Beispiel 1 in ein NMR-Röhrchen gegeben und mit 1 ml Lösungsmittel versetzt. Das Lösungsmittel war eine Mischung aus Deuteriochloroform:Deuteroacetonitril:D₂O im Verhältnis 3:2:1 mit einem pH-Wert zwischen 4 und 5. Die Proben wurden 200 Tage unter nachstehenden Bedingungen gelagert und in regelmäßigen Abständen die NMR-Spektren untersucht.

- Probe 1: unter Lichtausschluss bei - 20°C;
- Probe 2: unter Lichtausschluss bei +4-6°C;
- 15 Probe 3: unter Lichtausschluss bei Umgebungstemperatur;
- Probe 4: unter starker Lichteinwirkung (auf der Fensterbank) bei Umgebungstemperatur.

Die Proben 1 und 2 zeigten über die ganze Zeit keine wesentlichen Veränderungen im NMR-Spektrum. Eine HPLC-Analyse bestätigte, dass die Proben 1 und 2 auch nach 200 Tagen protisches Lösungsmittel intakt waren. Probe 3 zeigte eine minimale Veränderung im NMR-Spektrum nach 100 Tagen. Die HPLC-Analyse ergab, dass mehr als 78% der Verbindung noch intakt war. Probe 4 war nach 2 Monaten abgebaut.

Die Stabilitätsuntersuchung zeigt, dass die Verbindung unter Ausschluss von Licht sehr beständig ist, selbst in protischen Lösungsmitteln und ohne Kühlung.

Beispiel 3: 25-OH-Vit.D-ELISA mit 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether

Die Bestimmung erfolgte nach dem in Figur 2 gezeigten Prinzip. Hierzu musste zunächst 25-Hydroxy-Vitamin-D-3β-

3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether über Streptavidin an eine feste Phase gebunden werden.

(i) Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit Streptavidin

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde jeweils
 5 100 ng Streptavidin gegeben, gelöst in 200 µl 60 mM
 NaHCO₃, pH 9,6, und die Platte über Nacht bei 4°C
 inkubiert. Die Streptavidin-Lösung in den Vertiefungen
 wurde entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit 200 µl
 Waschpuffer (PBS, pH 7.4 mit 0.05% Tween-20) gewaschen.
 10 Dann wurde in jede Vertiefung 250 µl Assaypuffer gegeben.
 Für den Assaypuffer wurde 5 g Casein in 100 ml 0,1 N NaOH
 gelöst und mit PBS, pH 7,4 auf 1 L Volumen aufgefüllt.
 Die Lösung wurde eine Stunde gekocht, das Volumen mit
 destilliertem Wasser auf einen Liter ergänzt, der pH-Wert
 15 auf 7,4 eingestellt und 0,1 g Thimerosal zur Vermeidung
 von Mikrobenwachstum zugefügt. Die Vertiefungen in der
 Mikrotiterplatte wurden eine Stunde bei Raumtemperatur
 mit Assaypuffer inkubiert, dann der Assaypuffer entfernt
 und jede Vertiefung fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer
 20 gewaschen.

*(ii) Bindung von 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-3' [6-N-(bio-
 tinyl)hexamido]amidopropylether*

Es wurde in eine jede Vertiefung 100 µl Biotin-Vitamin-D-
 Lösung gegeben (10 ng 25-Hydroxy-Vitamin-D-3β-3' [6-N-
 25 (biotinyl)hexamido]amidopropylether in 100 µl Waschpuf-
 fer) und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln und
 unter Schütteln inkubiert. Dann wurde die Biotin-Vitamin-
 D-Lösung aus den Vertiefungen entfernt und jede Vertie-
 fung fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen.

30

Es folgte in flüssiger Phase die kompetitive Bindung von
 Vitamin-D-bindenden Protein in Gegenwart von 25-Hydroxy-
 Vitamin-D aus Standard oder Probe.

(iii) *Probenvorbereitung*

Es wurde 50 μ l Serum in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 μ l Ethanol_{abs} (vorgekühlt auf -20°C) durch Vortexen gemischt und 20 Minuten bei -20°C ausgefällt. Die Proben wurden in einer Eppendorf-Tisch-

5 zentrifuge bei maximaler Umdrehung zentrifugiert und die Überstände abgenommen und im ELISA eingesetzt.

Man kann in der Regel davon ausgehen, dass Plasma oder Serumproben bei 4°C etwa 2 Wochen stabil sind. Bei

10 längerer Lagerung müssen sie bis zur Bestimmung tiefgefroren werden. Urinproben müssen vor einer Lagerung mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6 und 8 eingestellt werden. Sie können dann bei 4°C etwa 14 Tage auf-

15 bewahrt werden; bei längerer Lagerung müssen auch sie bis zur Bestimmung tiefgefroren werden.

(iv) *Kompetitive Bindung*

Es wurde jeweils 100 μ l Vitamin-D-bindendes Protein, isoliert aus Ziegenserum (1:15000 in Assaypuffer mit 3%

20 (w/v) PEG 6000), zusammen mit 10 μ l Standard, Kontrolle oder Probe (10 μ l Überstand aus der Probenvorbereitung) in die Vertiefungen gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 24 Stunden bei 4°C im Dunkeln und unter Rütteln inkubiert. Dann wurden die Lösungen aus den Vertiefungen

25 entfernt und die Vertiefungen fünfmal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

(v) *Bestimmung der kompetitiven Bindung*

Es wurde jeweils 100 μ l Kaninchen-anti-Vitamin-D-Bindungsprotein (1:10000 verdünnt in Assaypuffer mit 3%

30 (w/v) PEG 6000) in die Vertiefungen gegeben und eine Stunde im Dunkeln und unter Rütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen wurden aus den Vertiefungen entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen. Die quantitative Bestimmung

erfolgte mit 100 μ l anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase (1:20 000 verdünnt in Waschpuffer). Es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden Antikörper-Lösungen abgenommen und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen. Für die Farbreaktion wurden 100 μ l Tetramethylbenzidin(TMB)-Substrat-Lösung (gebrauchsfertig von NOVUM Diagnostika GmbH, Dietzenbach, DE) in die Vertiefungen gegeben. Nach 30 Minuten wurde die Farbentwicklung gestoppt durch Zugabe von 50 μ l 2 M H_2SO_4 pro Vertiefung. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm. Die nachstehenden Tabellen II und III zeigen das Pipettierschema für die Mikrotiterplatte sowie die Werte für die optische Dichten.

Als Standard wurden Lösungen von 25-Hydroxyvitamin-D₃ in Assaypuffer mit folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nMol/L (siehe Eichkurve in Figur 5). Als Kontrolle bzw. Proben dienten vier Seren von Patienten mit einer D-Hypovitaminose (Proben-Nrn. 24, 203, 963, 965) und sowie vier willkürlich ausgewählte Normalseren (Proben-Nrn. NP 18, NP 25, NP 34, NP 37 - Testreihen 3 und 4). Von den Vitamin-D-Mangelseren wurde zudem die 25-Hydroxyvitamin-D-Konzentration durch kompetitiven Bindungsassay mit Hilfe von ³H-25-Hydroxy-Vitamin-D bestimmt. Als weitere "Kontrolle" dienten vier Lösungen, bei denen die jeweilige Konzentration an 25-Hydroxyvitamin-D aus anderweitigen Bestimmungen bekannt war, entweder aus den Herstellerangaben oder durch einen kompetitiven Bindungsassay (CBPA) mit ³H-25-Hydroxy-Vitamin-D.

Tabelle II

Probenanordnung

Pipettier Schema	Standard nMol / L	Doppelwert von Spalte 1	Serumprobe Nr.	Doppelwert von Spalte 3	Kontrollen	Doppelwert von Spalte 5
Reihe / Spalte	1	2	3	4	5	6
A	NSB	NSB	24	24	K1 (CBPA)	K1 (CBPA)
B	0	0	203	203	K2 (CBPA)	K2 (CBPA)
C	8	8	963	963	K3 (HPLC)	K3 (HPLC)
D	20	20	965	965	K4 (HPLC)	K4 (HPLC)
E	50	50	NP 18	NP 18		
F	125	125	NP 25	NP 25		
G	312	312	NP 34	NP 34		
H			NP 37	NP 37		

5

NSB: Nichtspezifischer Bindungspuffer (Assaypuffer ohne Vitamin-D-Bindungsprotein)

Tabelle III

Messwerte nach 30 Minuten Farbentwicklung

10

OD 450 nm	Standard	Doppelwert zu Spalte 1	Serumprobe Nr.	Doppelwert zu Spalte 3	Kontrollen	Doppelwert zu Spalte 5
Reihe / Spalte	1	2	3	4	5	6
A	---	---	0,947	1,023	1,903	2,300
B	2,256	2,182	0,853	0,910	0,393	0,371
C	1,845	1,861	0,646	0,637	1,674	1,586
D	1,432	1,456	1,429	1,303	0,578	0,634
E	0,625	0,612	0,524	0,547		
F	0,287	0,261	0,454	0,419		
G	0,156	0,176	0,341	0,368		
H	---	---	0,421	0,386		
B _{max}	2,801	2,676				

Aus den Mittelwerten der Spalten 1 und 2 und den bekannten Konzentration an 25-Hydroxyvitamin-D wurde die in Figur 5 gezeigt Eichkurve erstellt. Die Ordinate zeigt die optische Dichte als Mittelwert der beiden Messungen bei 450 nm; die Abszisse die Konzentration an 25-Hydroxy-Vitamin-D in nMol/l. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

Beispiel 4: Vergleichende Bindungsanalyse mit ^3H -25-OH-Vitamin-D als kompetitiver Partner

Soweit nicht anders angegeben ist, waren alle Reagenzien Puffer und Materialien gleich wie im vorgenannten Beispiel 3. Als kompetitiver Bindungspartner (Tracer) diente Tritium-markiertes 25-Hydroxyvitamin-D₃.

Abweichend zu Beispiel 3 wurden die Messproben durch Extraktion (in Einzelwerten) aufgereinigt. Hierzu wurde jeweils 50 µl Probe [nicht-spezifischer Assaypuffer NSB, Standard, Kontrolle, Patientenprobe (Plasma, Serum oder Urin)] in ein 1.5 ml Einmalreaktionsgefäß gegeben, 200 µl Acetonitril hinzugefügt, gemischt, die Gefäßwände freizentrifugiert, und die Mischung 20 bis 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 1700 x g zentrifugiert. Die Bestimmungen erfolgten in Doppelwerten mit den Überständen.

Hierzu wurde 25 µl klarer Überstand in ein Glasröhrchen (oder in ein Spezial-RIA-Gefäß von Sarstedt, Darmstadt) überführt, und 10 µl Tracer (^3H -25-OH-D), 300 µl Assaypuffer und 100 µl Vitamin-D-bindendes Protein (nicht in NSB) hinzugeben. Der Röhrcheninhalt wurde gemischt, eine Stunde bei 4°C inkubiert, und zum Entfernen von nicht gebundenem radioaktiven Tracer 100 µl Aktivkohlesuspension (aktivkohlehaltiger Phosphatpuffer mit 0,1% NaN_3)

zugegeben. Der Röhrcheninhalt wurde gemischt, 3 bis 5 Minuten bei 4°C inkubiert, und die Aktivkohle durch 10 Minuten Zentrifugieren bei 1700 x g pellettiert. Es wurde dann jeweils 400 µl Überstand in ein Zählgefäß (7 ml) überführt und nach Zugabe von 2 ml Szintillatorflüssigkeit wie Aquasafe® 300 oder HiSafe® III die im Überstand befindliche Radioaktivität gezählt (2 Minuten in einem Beta-Counter). Die Messwerte für die Kontrollen nach Erstellung der Eichkurve sind in Tabelle 5 gezeigt.

Der Vergleich mit dem ELISA nach Beispiel 3 zeigt, dass für beide Assayverfahren (ELISA und CBPA) gilt, dass der Normbereich für 25-Hydroxyvitamin-D im Plasma oder Serum etwa 25 - 125 nmol/l ist.

Die Nachweisgrenze dieser Testsysteme wurde festgesetzt als $B_0 + 2SD$. Sie beträgt etwa 2,5 nmol/l.

Kreuzreaktionen: Zu Aktivkohle behandeltem Serum wurde 25-OH-Vitamin-D₂ (125 nmol/l), 24,25-(OH)₂-Vitamin-D₃ (250 nmol/l) und 1,25-(OH)₂-Vitamin-D₃ (250 nmol/l) zugesetzt. Das 25-OH-Vitamin-D₂ reagierte zu 60%, das 24,25-(OH)₂-Vitamin-D₃ zu 100% kreuz, während das 1,25-(OH)₂-Vitamin-D₃ keine Kreuzreaktivität zeigte. Ähnliche Ergebnisse werden auch für erfindungsgemäße multifunktionelle 25-Hydroxyvitamin-D-Konjugate gefunden bzw. erwartet.

Reproduzierbarkeit: In Wiederholungsmessungen (n=11) einer 25-Dihydroxy-Vitamin-D₃-haltigen Probe wurden nachstehende Resultate erzielt. Ähnliches gilt auch für Messungen mit Hilfe der multifunktionellen 25-Hydroxyvitamin-D-Konjugate gemäß der Erfindung:

Tabellen IV

Intraassayvarianz:

	Anzahl	Mittelwert nmol/l	VK %
Probe 1	32	11,3	12,5
Probe 2	32	318	7,2

5

Interassayvarianz

	Anzahl	Mittelwert nmol/l	VK %
Probe 1	9	9,9	17
Probe 2	9	310	11

10

Klinik:

	Anzahl	Mittelwert nmol/l
Normalpersonen	35	54
Patienten mit Schenkelhalsbrüchen	43	9,5

15

Für die in Beispiel 3 genannten Proben wurden mit den Verfahren nach Beispiel 3 und 4 folgende 25-Hydroxyvitamin-D-Konzentrationen ermittelt.

20

Tabelle V

Serumproben Nr.	ELISA mit 25-OH-D- Biotin nMol / L	CBPA mit ³ H-25-OH- D nMol / L		Kontrollen	ELISA mit 25-OH-D- Biotin nMol / L	Alternative Bestimmung nMol / L
24	32,9	33,3		K1	Fehlwert	20 (a)
203	36,8	29,19		K2	76,8	75-125 (a)
963	48,9	38,4		K3	15,0	20-33 (b)
965	21,8	15,8		K4	51,3	72-120 (b)
NP 18	57,0					
NP 25	67,9		(a) CBPA mit ³ H-25-OH-D (b) Herstellerangabe			
NP 34	82,4					
NP 37	72,9					

Die von den Herstellern angegebenen Werte waren generell höher als die im kompetitiven Bindungsassay ermittelten Konzentrationen. Dies lässt vermuten, dass sich in den überlassenen Proben bereits ein erheblicher Teile des 25-Hydroxyvitamin-D zersetzt bzw. durch Lichteinwirkung umgelagert hat.

Beispiel 5: Kontrolle der ELISA-Bestimmung durch HPLC

Es wurden daher in verschiedenen Proben die 25-Hydroxyvitamin-D-Konzentration durch ELISA gemäß Beispiel 3 und zur Kontrolle durch HPLC nachbestimmt. Für die Eichkurve wurden Standards verwendet mit Vitamin-D₃-Konzentrationen von 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nMol/l. Alle Proben und Standards wurden in Doppelwerten bestimmt. Die 25-Hydroxyvitamin-D₃-Konzentration der Proben wurde dann anhand der Eichkurve aus den Mittel der Doppelwerte berechnet.

Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle VI gezeigt.

Tabelle VI

Probe	25(OH)-Vitamin-D ₃ [nMol/L]	
	HPLC	ELISA
1	20-33	30
2	72-120	76
3	79-102	96
4	< 15	< Nachweisgrenze
5	< 15	7,4

Beispiel 6: Langzeitstabilität von 25-Hydroxyvitamin-D-Konjugat in der ELISA-Bestimmung.

Es wurden Eichkurven mit gleichen Standardlösungen und Reagenzien gemäß dem Beispiel 3 nach 60 und 100 Tagen wiederholt, um zu ermitteln, inwieweit sich eine ELISA-Bestimmung mit erfindungsgemäßen Biotin-25-Hydroxyvitamin-D-Konjugat im Laufe der Zeit verändert, wenn die Reagenzien zwischenzeitlich bei 4 bis 6°C im Dunkeln gelagert werden. Die nachstehende Tabelle zeigt die jeweiligen optischen Dichten nach 30 Minuten Entwicklung (siehe Beispiel 3)

5

10

15

Tabelle VII

Standard	Standard	Doppelwert zu Spalte 1	Nach 60 Tagen	Doppelwert zu Spalte 3	Nach 100 Tagen	Doppelwert zu Spalte 5
nMol/L	1	2	3	4	5	6
NSB	---	---	0,191	0,280	0,088	0,109
0	2,256	2,182	2,227	2,285	1,471	1,562
8	1,845	1,861	2,041	2,125	1,345	1,366
20	1,432	1,456	1,860	1,903	1,079	1,060
50	0,625	0,612	1,293	1,214	0,610	0,690
125	0,287	0,261	0,606	0,615	0,442	0,329
312	0,156	0,176	0,448	0,434	0,293	0,257

Werden die Werte der verschiedenen Eichkurven, abzüglich
 5 der jeweiligen nichtspezifischen Bindung, in ein Diagramm
 nach Figur 3 aufgetragen, so ist leicht ersichtlich, dass
 die Eichkurven abgesehen einer relativen vertikalen
 Verschiebung die gleiche Form besitzen. Dies zeigt, dass
 sich die Empfindlichkeit und Spezifität der ELISA-
 10 Bestimmungen über den genannten Zeitraum nicht verändert
 hat.

Beispiel 7: 25(OH)-Vitamin-D₃-ELISA-MTP mit anti-Vitamin- D-Bindungsprotein

15 Der Versuch erfolgte im Wesentlichen nach dem Protokoll
 von Beispiel 3 und dem in Figur 4 gezeigten Prinzip. Es
 wurden folgende Puffer verwendet: a) Waschpuffer: PBS, pH
 7.4 mit 0.05% Tween-20; b) Assaypuffer: 5 g Casein wurden
 in 100 ml 0.1 N NaOH gelöst und mit PBS, pH 7,4 auf 1 l
 20 aufgefüllt. Dann wurden 3% (w/v) PEG-6000 sowie 0.1 g
 Thimerosal hinzugefügt. Alle Inkubationen erfolgten im
 Dunkeln und unter Schütteln.

(i) Beschichtung der Mikrotiterplatte

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 μ l Kaninchen-anti-Vitamin-D-Bindungsprotein in 60 mM NaHCO₃, pH 9,6 gegeben und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Lösungen wurden entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit 200 μ l Waschpuffer gewaschen. Dann wurde 250 μ l Assaypuffer in jede Vertiefung gegeben und die Platte eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Assaypuffer wurde entfernt und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

(ii) Probenvorbereitung

Es wurde 50 μ l Serum, Plasma oder Standard in einem 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 μ l Ethanol_{abs} (vor-gekühlt auf -20°C) gemischt, gevortex und dann 20 Minuten bei -20°C ausgefällt. Die Proben wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und im ELISA eingesetzt.

(iii) ELISA

Als Erstes wurde in eine jede Vertiefung 100 μ l Vitamin-D-Bindungsprotein, verdünnt in Assaypuffer, gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Platte ausgeschlagen und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

Danach wurden je 100 μ l Biotin-Vitamin-D, verdünnt in Assaypuffer, zusammen mit 10 μ l Standard, Probe oder Kontrolle in die Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Lösungen wurden wiederum entfernt und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

Als Drittes wurde jeweils 100 μ l Peroxidase-gekoppelpeltes Streptavidin einer 1:10000-Verdünnung in Waschpuffer in

die Vertiefungen gegeben und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde ausgeschlagen und jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

5

Für die Farbreaktion wurden 100 μ l TMB-Substrat-Lösung in jede Vertiefung gegeben. Nach ausreichender Farbentwicklung (30 Minuten) wurde die Reaktion mit 50 μ l 2M H_2SO_4 pro Vertiefung beendet. Die Messungen der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm. Es wurden ähnliche bis gleiche Ergebnisse erhalten, wie in Beispiel 3 bzw. Tabelle V.

10

Beispiel 8: Inhalt einer Testpackung bzw. eines Reagenziensatzes zur Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin-D und $1\alpha,25$ -Hydroxyvitamin-D:

15

Inhalt der Testpackung bzw. Testreagenzien und deren Vorbereitung:

Standards, bspw. 6 Fläschchen 25-Hydroxyvitamin-D-Standards mit den Konzentrationen 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nmol/l; gebrauchsfertig in Waschpuffer.

20

Mikrotiterplatten, bspw. mit Streptavidin beschichtet, steril verpackt und vorgewaschen.

25

Pufferlösungen, bspw. Waschpuffer, NSB-Puffer und Assaypuffer, Stopplösung.

Kontrollen, bspw. zwei Fläschchen 25-Hydroxyvitamin-D-Kontrollen in Humanserum. Kontrolle 1 (30 nMol 25-OH-D/L), Kontrolle 2 (80 nMol 25-OH-D/L).

30

M 23.08.99

34

Tracer, bspw. ein Fläschchen mit Biotin-Vitamin-D (25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3 β -3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether) in Waschpuffer (100 ng/ml)

- 5 **Vitamin-D-Bindungsprotein**, bspw. ein Fläschchen mit Bindungsprotein aus Ziegenserum in Phosphatpuffer mit 0,1% NaN₃ als Stabilisator.

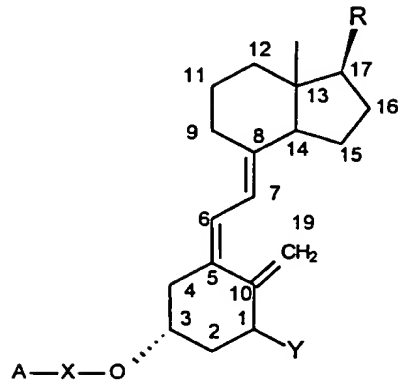
- 10 **Marker**, bspw. ein Fläschchen anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase in Waschpuffer.

TMB-Entwicklerlösung, bspw. ein Fläschchen stabilisierte Tetramethylbenzidin-Entwicklerlösung in Waschpuffer.

15

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Vitamin-D-Derivat der Formel:



(I)

worin ist:

- O das Sauerstoffatom einer Ethergruppe;
- X eine substituierte oder unsubstituierte Kohlenwasserstoffstoffgruppe von 0,8 bis 4,2 nm Länge, die übliche Heteroatome wie S, O, N oder P aufweisen kann;
- Y Wasserstoff oder Hydroxy;
- A eine Tracer-Gruppe, die von einem bindenden Protein mit hoher Affinität gebunden werden kann;
- R eine substituierte oder unsubstituierte Kohlenwasserstoff-Seitengruppe von Vitamin-D oder eines Vitamin-D-Metabolits, eine Seitengruppe von Vitamin-D₂ oder D₃, die 25-Hydroxy-Seitengruppe von Vitamin-D₂ oder -D₃.

2. Vitamin-D-Derivat nach Anspruch 1, wobei A ausgewählt ist aus Biotin, Digoxigenin, Tyrosin, FITC substituiertem Tyrosin, substituierten Aminosäuren, charakteristischen Aminosäure- und Peptidsequenzen, FITC, Proteinen und Peptidgruppen, Protein A,

Protein G, Vitamin-D-Derivaten, 25-Hydroxyvitamin-D.

3. Vitamin-D-Derivat nach Anspruch 1, wobei A eine
5 Verbindung ist der Formel (I), welche in der 3 β -
Stellung über eine Etherbrücke mit der
Abstandsgruppe X verbunden ist.
4. Vitamin-D-Derivat nach irgendeinem Anspruch 1 bis 3,
10 wobei die Abstandsgruppe eine Länge von 0,8 bis 2
nm, besonders bevorzugt 0,9 bis 1,5 nm.
5. Vitamin-D-Derivat nach irgendeinem Anspruch 1 bis 4,
15 wobei die Abstandsgruppe eine Aminocarbonsäure-, ein
Aminoundecansäure- oder ein Aminopolyetherrest ist.
6. Verfahren zur Herstellung eines Vitamin-D-Derivats
nach irgendeinem Anspruch 1 bis 5, umfassend die
20 Schritte:
a) Cyanoethylierung von 25-Hydroxy-Vitamin-D mit
Acrylnitril in einem Gemisch mit Acetonitril,
Kaliumhydrid und tert-Butanol und
b) Reduktion der Nitrilgruppe mit LiH/LiAlH₄.
- 25 7. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von 25-
Hydroxy- und 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Metabolit in
einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass ein
Vitamin-D-Derivat nach irgendeinem Anspruch 1 bis 5
als Bindungspartner eingesetzt wird.
30
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Verfahren eine
Proteinbindungsanalyse umfasst.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Verfahren die
35 Bindung an einen Rezeptor umfasst.

10. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Verfahren eine Bindung an einen Antikörper umfasst.
- 5 11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Verfahren ein kompetitiver Immunoassay ist, ausgewählt aus RIA, EIA/ELISA, LiA und FiA.
- 10 12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Verfahren ein Sandwich-Immunoassay ist, ausgewählt aus IRMA, IEMA/EUA, ILMA (Immunolumineszenzassay) und IFMA (Immunofluoreszenzassay).
- 15 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, umfassend eine feste Phase, ausgewählt aus Mikrotiterplatte und anderen festen Trägern, Mikropartikel, bevorzugt aus Agarose, polymerem Material, Cellulose, magnetische Mikropartikel.
- 20 14. Verfahren nach einem Anspruch 7 bis 13, wobei das Verfahren automatisierbar in Flüssig- oder Festphase erfolgt.
- 25 15. Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Metaboliten nach irgendeinem Anspruch 7 bis 14, umfassend die Schritte:
 - a) Beschichten eines festen Trägers mit Streptavidin;
 - b) Zugabe von Biotin-Vitamin-D-Derivat nach irgendeinem Anspruch 1 bis 5;
 - 30 c) Zugabe der Probe und einer definierten Menge Vitamin-D-bindendes Protein;
 - d) Bestimmung des gebundenen Bindungsproteins mit markierten Antikörpern gegen Vitamin-D-bindendes Protein.

16. Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D-Metaboliten nach irgendeinem Anspruch 7 bis 14, umfassend die Schritte:
 - a) Beschichten eines Trägers mit Antikörpern gegen Vitamin-D-bindendes Protein;
 - b) Zugabe von Vitamin-D-bindendes Protein;
 - c) Zugabe der Probe sowie einer definierten Menge Biotin-gekoppeltes Vitamin-D-Derivat nach Anspruch 1;
 - d) Bestimmung der Menge gebundenes Derivat mit markiertem Streptavidin.
17. Verfahren nach irgendeinem Anspruch 7 bis 16, wobei die Bestimmung erfolgt durch Markierung mit einem Enzym, das eine Nachweisreaktion katalysiert.
18. Reagenziensatz zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D-Metaboliten nach einem Verfahren gemäß irgendeinem Anspruch 7 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass er eine standardisierte Menge Feststoff oder Lösung eines Vitamin-D-Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 aufweist.

M 23.08.99

Fig. 1

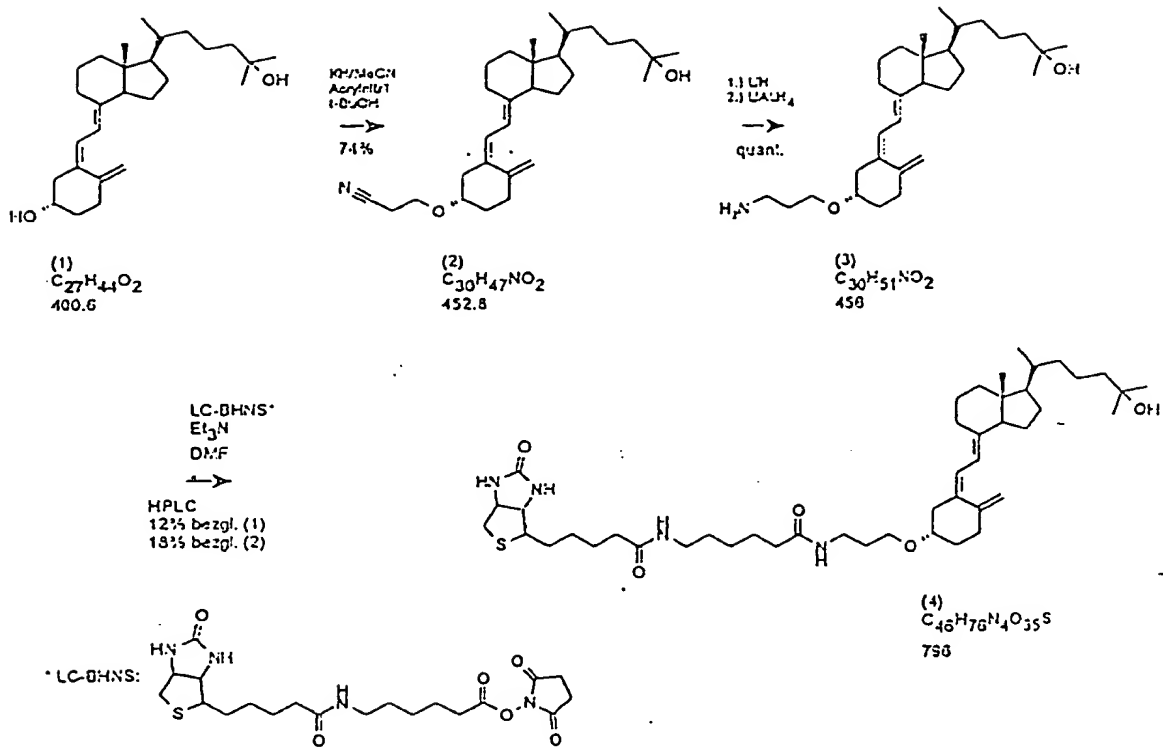


Fig. 2

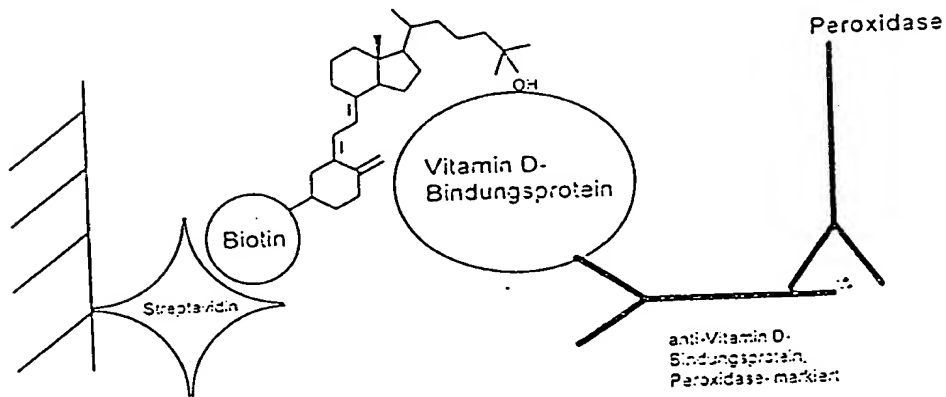


Fig. 3

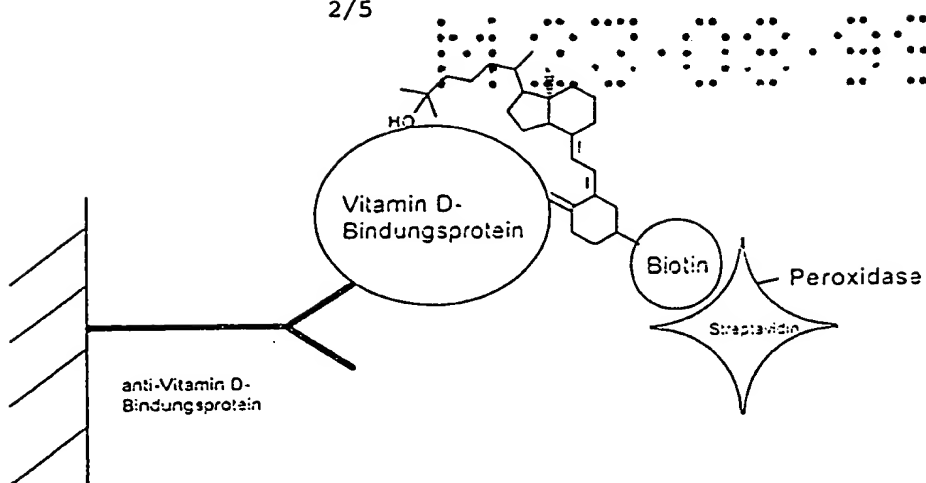


Fig. 4

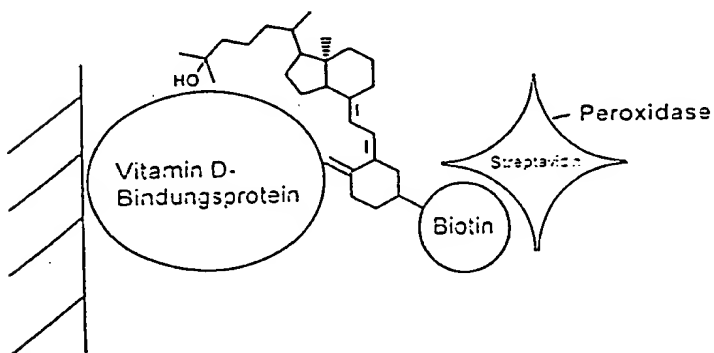
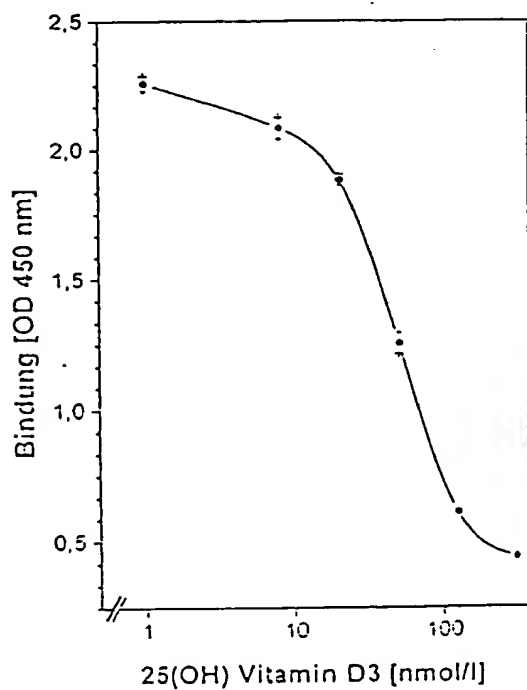


Fig. 5A



H 23 00 99

Fig. 6

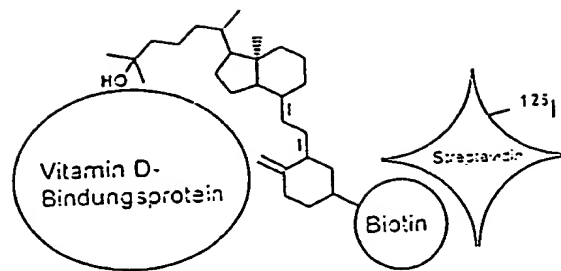


Fig. 17

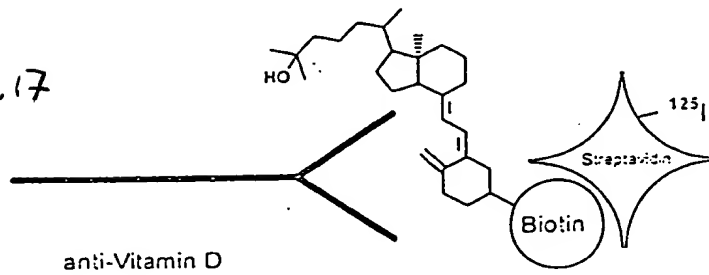


Fig. 8

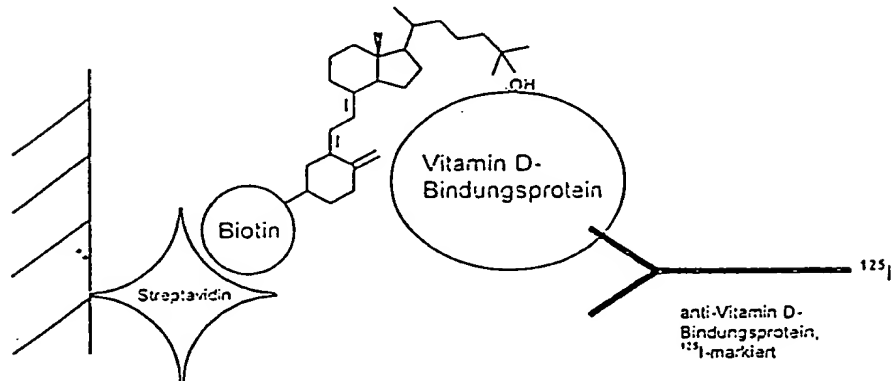
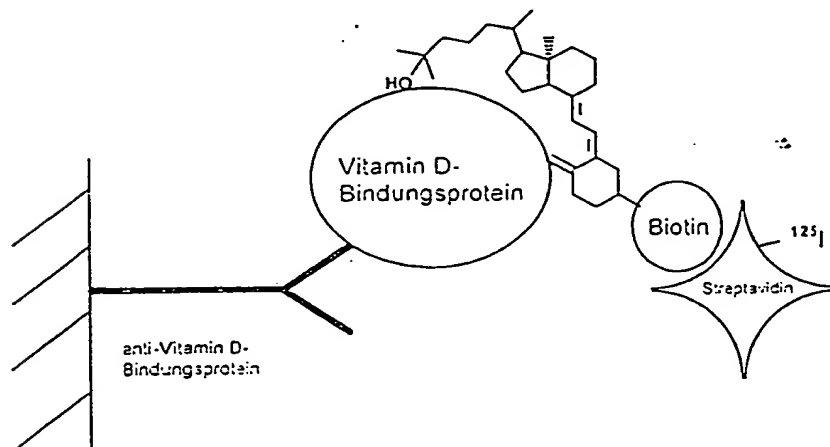


Fig. 9



M 23 00 00

Fig. 10

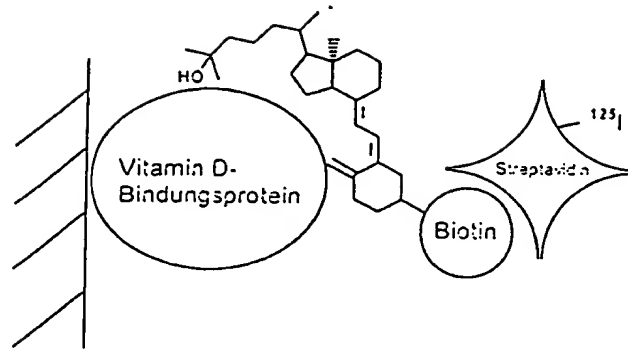


Fig. 14

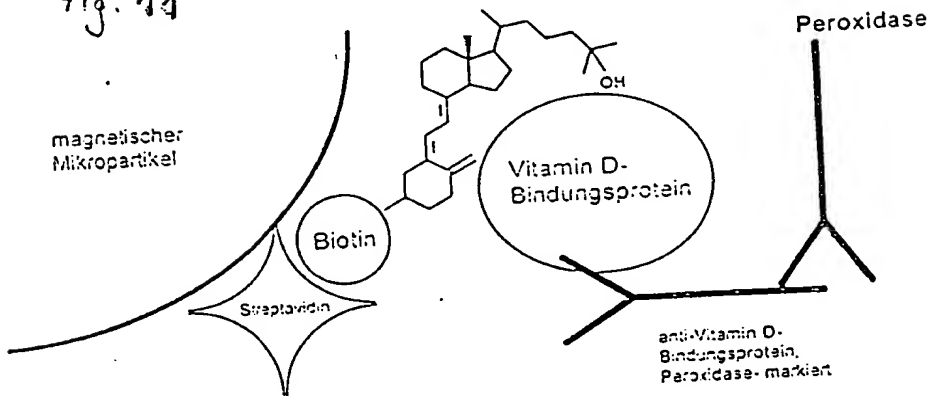


Fig. 12

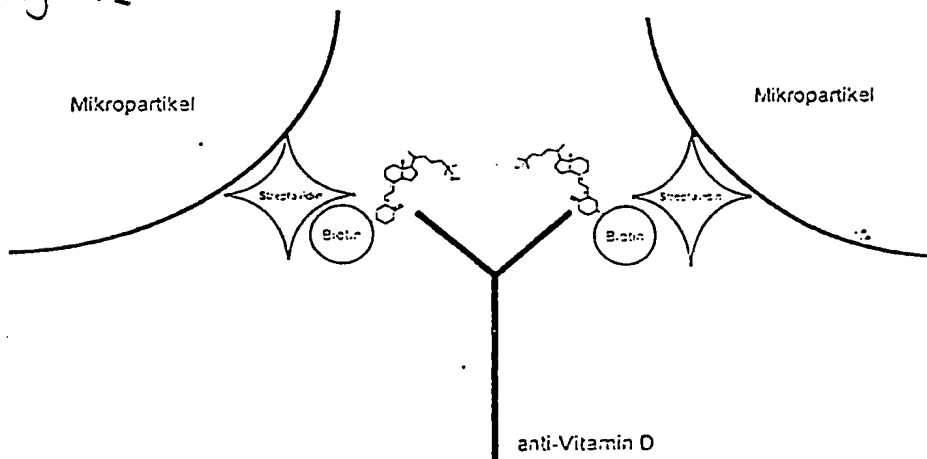


Fig 5B

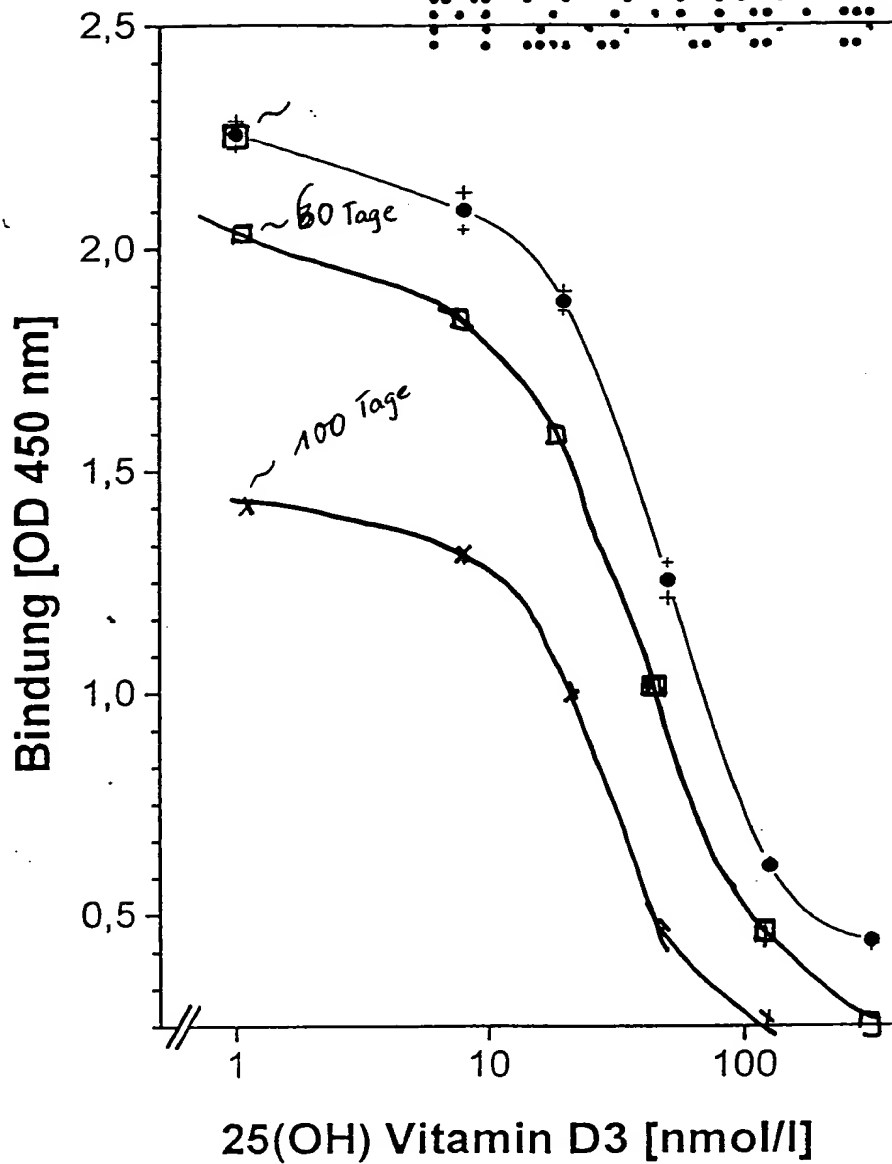


Fig. 13

